

**Análise da citotoxicidade e genotoxicidade de
Hibiscus sabdariffa L. *in natura* e industrializado, e
comparação da toxicidade entre as formas analisadas da
planta**

***Analysis of the cytotoxicity and genotoxicity of
Hibiscus sabdariffa L. *in natura* and industrialized, and
comparison of the toxicity between the analyzed forms of
the plant***

***Análisis de la citotoxicidad y genotoxicidad de
Hibiscus sabdariffa L. *en natura* e industrializado, y
comparación de la toxicidad entre las formas analizadas de la
planta***

Michele Vieira da Silva Lima¹
Clarice de Moraes Guedes²
Maria Carolina de Abreu³
Ana Paula Peron⁴

¹ Bióloga pela Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Picos, Piauí. E-mail: michelelima23@outlook.com

² Bióloga pela Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Picos, Piauí. E-mail: clariceguedes92@gmail.com

³ Doutora em Botânica pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Docente Adjunta IV no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Picos, Piauí. E-mail: mariacarolinabreu@hotmail.com

⁴ Doutora em Genética e Melhoramento pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Docente Adjunta IV no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Picos, Piauí. E-mail: anapaulaperon@ufpi.edu.br

Resumo: A flores de *Hibiscus sabdariffa*, o hibisco, são utilizadas na prevenção e tratamento de diversas enfermidades. Comercialmente, tais flores são encontradas nas formas *in natura*, recomendadas para uso na forma de chá, e industrializada, como produto farmacêutico acrescido de aditivos excipientes. Objetivou-se avaliar neste estudo, em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*, nos tempos de exposição 24 e 48 horas, o potencial citotóxico e genotóxico de flores de hibisco em chá, nas concentrações 0,10; 0,20 e 0,40 mg/ml; e industrializadas, provenientes de dois diferentes laboratórios farmacêuticos, denominados aqui de A e B, nas concentrações 0,15; 0,30 e 0,60 mg/ml. As três concentrações de chá não foram tóxicas as células meristemáticas. Porém, as três concentrações dos produtos LF B e LF A foram citotóxicas e genotóxicas, respectivamente, aos meristemas de raízes. Portanto, houve diferença de toxicidade celular entre os hibiscos *in natura* e os hibiscos industrializados.

Palavras-chave: hibisco; excipientes; divisão celular; alterações celulares; tecido meristemático.

Abstract: The flowers of *Hibiscus sabdariffa*, the hibiscus, are used in the prevention and treatment of various diseases. Commercially, such flowers are found in the forms *in natura*, recommended for use in the form of tea, and industrialized, as a pharmaceutical product plus excipients additives. It was intended to evaluate in this study, in meristematic cells of roots of *Allium cepa*, in the times of exposure 24 and 48 hours, the potential cytotoxic and genotoxic of hibiscus flowers in tea, in the concentrations 0.10; 0.20 and 0.40 mg/ml; and industrialised, from two different pharmaceutical laboratories, referred to here as A and B, at concentrations 0.15; 0.30 and 0.60 mg/ml. The three concentrations of tea were not toxic to the meristematic cells. However, the three concentrations of the LF B and LF A products have been cytotoxic and genotoxic respectively to the meristem of roots. Therefore, there was a difference in cellular toxicity between hibiscus *in natura* and the industrialized hibiscus.

Keywords: hibisco; excipients; cell division; cellular alterations; meristematic tissue.

Resumen: Las flores de *Hibiscus sabdariffa*, el hibisco, se utilizan en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. Comercialmente, estas flores se encuentran en las formas *in natura*, recomendadas para su uso en forma de té, e industrializadas, como producto farmacéutico más aditivos excipientes. Se pretendió evaluar en este estudio, en células meristemáticas de raíces de *Allium cepa*, en los tiempos de exposición 24 y 48 horas, el potencial citotóxico y genotóxico de flores de hibisco en el té, en las concentraciones 0,10; 0,20 y 0,40 mg/ml; e industrializado, a partir de dos laboratorios farmacéuticos diferentes, referidos aquí como a y B, a concentraciones 0,15; 0,30 y 0,60 mg/ml. Las tres concentraciones de té no eran tóxicas para las células meristemáticas. Sin embargo, las tres concentraciones de los productos LF B y LF A han sido citotóxicas y genotóxico respectivamente a la meristemo de raíces. Por lo tanto, hubo una diferencia en la toxicidad celular entre hibisco *in natura* y el hibisco industrializado.

Palabras clave: hibisco; excipientes; división celular; alteraciones celulares; tejido meristemático.

1 INTRODUÇÃO

A *Hibiscus sabdariffa* L., pertencente à Família Malvaceae, planta originária da Índia, Sudão e Malásia, é conhecida popularmente no Brasil como hibisco, azedinha, azeda-da-guiné, caruru-azedo e vinagreira. Essa planta é classificada como um arbusto perene com, em média 3m de altura. Na medicina, suas flores são amplamente utilizadas como diurético, antimicrobiano e antioxidante e para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, bem como de infecções hepáticas.

As flores de hibisco são constituídas por altas concentrações de compostos fenólicos, ácidos orgânicos, esteroides, terpenoides, polissacarídeos e minerais. Dentre os compostos fenólicos reportados na literatura, as antocianinas glicosiladas são as mais abundantes e também os principais constituintes biologicamente ativos dessa planta. Tais flores configuram-se entre os fitoterápicos mais consumidos no Brasil, sendo utilizadas na forma *in natura*, no qual são encontradas em ervanários e hortos medicinais, e na forma industrializada, caracterizada como produto farmacêutico oriundo de diferentes laboratórios farmacêuticos.

Como procedimento padrão, produtos farmacêuticos naturais, como as flores de hibisco, durante a industrialização são aditivados por compostos químicos excipientes, que são microingredientes inativos destituídos de atividades terapêuticas e adicionados intencionalmente. Esses ingredientes têm a finalidade de tornar, entre outras características, medicamentos palatáveis e protegidos da ação de microrganismos. Dentre os aditivos excipientes extensivamente utilizados pelos laboratórios farmacêuticos, estão os conservantes, corantes, aromatizantes, edulcorantes, espessantes, emulsificantes e estabilizantes. A escolha de um excipiente, bem como sua concentração, para um mesmo produto farmacêutico, natural ou sintético, varia conforme a indústria farmacêutica que o produz.

No entanto Agência de Vigilância Sanitária, em seus regulamentos técnicos, declara que os excipientes de ação aromatizante, edulcorantes, antiumectante e acidulantes, apesar de liberados para uso, suscitam uma série de dúvidas quanto aos seus potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Destaca, ainda, a relevância e importância na realização de

pesquisas que avaliem os efeitos citotóxicos e genotóxicos de produtos aditivados por tais microingredientes artificiais. Os efeitos adversos observados a partir dessas avaliações são de grande relevância, uma vez que são importantes parâmetros na elaboração e/ou modificação de documentos que normatizam o uso de excipientes pelas indústrias.

Os bioensaios vegetais são considerados apropriadamente sensíveis e simples no monitoramento dos efeitos tóxicos em nível celular de compostos químicos. Dentre eles, os meristemas de raízes de *Allium cepa* L. são considerados, no meio científico, um eficiente ensaio para o *screening* inicial da toxicidade genética de compostos químicos em razão de apresentarem número cromossômico reduzido, o que favorece a detecção de alterações de fuso mitótico ou aneugênicas, e de distúrbios no índice proliferação celular. Ademais, é um sistema aceito internacionalmente por agências de pesquisa como um instrumento de avaliação de acurada sensibilidade para análise da citotoxicidade e genotoxicidade de substância de interesse econômico e/ou social, como extratos de plantas, aditivos excipientes e medicamentos sintéticos, uma vez que os resultados obtidos por intermédio dele demonstram, em grande parte das vezes, similaridade satisfatória àquelas obtidas via sistemas testes animal e em culturas de células.

Assim, com base no contexto abordado, foram objetivos do presente estudo avaliar, de modo preliminar, por meio das células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, o potencial citotóxico e genotóxico de flores de *H. sabdariffa* nas formas *in natura* e industrializadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e definição das concentrações para avaliação de *Hibisco sabdariffa*, *in natura* e industrializados

A flores de *Hibisco sabdariffa* (Família Malvaceae) *in natura* foram obtidas em ervanário localizado na cidade de Teresina, Piauí Brasil, especializado na comercialização de produtos naturais. Nas formas industrializadas, as flores de hibisco em pó, foram adquiridas em farmácia do município de Teresina, Piauí, Brasil, representante de uma rede nacional

de drogarias. Os produtos industrializados, oriundos de dois diferentes laboratórios farmacêuticos (LF), foram discriminados na presente pesquisa como A e B.

Para a determinação das concentrações de hibisco a serem analisadas quanto à toxicidade em nível celular, utilizou-se como parâmetro de definição a forma de preparo e ingestão indicada nos rótulos de cada produto, *in natura* e industrializados. Para o produto *in natura*, recomendava-se o preparo de chá a partir de 200 g de flores de hibisco para um litro de água fervente. Assim, as concentrações definidas para análise do chá foram: 0,10; 0,20 e 0,40 g/ml. Para os dois produtos industrializados, recomendava-se ingerir 60 g de hibisco em pó diluídas em 200 ml de água, definindo-se para análises as concentrações 0,15; 0,30 e 0,60 g/ml. Para o preparo de todas as concentrações utilizou-se água destilada.

2.2 Teste de citotoxicidade em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*

Inicialmente, bulbos de cebolas foram colocados em frascos aerados com água destilada até a obtenção de raízes de 2,0 cm de comprimento. Para análise de toda concentração em estudo (tratamento), foi estabelecido um grupo experimental com cinco bulbos de cebola. Antes de colocar as raízes em contato com a seus respectivos tratamentos, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle do próprio bulbo, o que se nominou de tempo de análise zero hora. Logo depois, as raízes restantes foram postas em suas respectivas concentrações por 24 e 48 horas, procedimentos denominados de tempos de exposição 24 e 48h, quando se realizou coleta de raízes a cada 24 horas. As raízes coletadas foram fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas.

As lâminas foram confeccionadas segundo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Para cada bulbo analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada grupo controle (0h), grupo tempo de exposição 24h e grupo tempo de exposição 48h. Foram contabilizadas células em interfase e em divisão celular e estabelecido o índice mitótico, que serviu como parâmetro para a determinação da citotoxicidade. Ainda, avaliou-se a genotoxicidade

através da frequência de micronúcleos, e de alterações aneugênicas ou de fuso mitótico, como metáfases colchícinicas, pontes anáfasicas e telofásicas, ampliações gênicas, células com aderências, brotos nucleares e anáfases multipolares. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste estatístico Qui-quadrado (χ^2) a 5% (AYRES et al., 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados no Quadro 1, verifica-se que as três concentrações analisadas do chá de hibisco, bem como as três concentrações analisadas do produto LF A dessa planta, nos tempos de análises considerados, não causaram redução estatisticamente significativa da divisão celular nos meristemas de raízes de *A. cepa* quando comparados aos índices mitóticos obtidos para os seus respectivos controles. Assim, o chá e o medicamento LF A, nas condições de estudos estabelecidas, não foram citotóxicos ao bioensaio utilizado. Diferentemente, as três concentrações analisadas do produto industrializado de flores de hibisco LF B, causaram, nas 24 e 48 horas de exposição, expressiva redução da divisão celular dos meristemas de raízes, quando confrontados com os seus específicos tempo de análise 0h, mostrando-se potencialmente citotóxicas (Quadro 1). A citotoxicidade observada para LF B foi estatisticamente significativa quando comparada à citotoxicidade obtida para a planta *in natura* e para LF A, considerando os respectivos tempos de exposição entre os produtos analisados.

Quadro 1 – Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de *Allium cepa* expostos a três concentrações de chá de flores de *Hibiscus sabdariffa* nas concentrações 0,10; 0,20 e 0,40 mg/mL, e a dois produtos industrializados dessa planta.

Hibiscus sabdariffa	TR (mg/ml ⁻¹)	TE/IM		
		0 h	24 h	48 h
Chá	0,01	17,1 ^a	18,4 ^a	15,9 ^a
	0,02	16,1 ^a	17,1 ^a	15,7 ^a
	0,04	15,5 ^a	16,2 ^a	15,8 ^a
LF A	0,15	19,9 ^a	17,1 ^a	16,2 ^a
	0,30	16,3 ^a	18,3 ^a	14,3 ^a
	0,60	19,0 ^a	20,4 ^a	15,3 ^a
LF B	0,15	20,0 ^a	4,0 ^{b*}	2,4 ^{b*}
	0,30	19,3 ^a	8,5 ^{b*}	4,5 ^{b*}
	0,60	19,7 ^a	7,3 ^{b*}	4,3 ^{b*}

Legenda: TE: tempo de exposição; IM: índice mitótico; LF: laboratório farmacêutico; Co: controle negativo; TR: tratamento. Valores seguidos da mesma letra dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si pelo teste χ^2 , ao nível de 5%. Valores seguidos de asteriscos diferem estatisticamente dos valores obtidos para o chá e para LF A, considerando os mesmos tempos de exposição.

Apesar de não citotóxicas ao sistema teste *A. cepa*, todas as concentrações referentes ao hibisco LF A promoveram, em número significativo, alterações celulares aos tecidos analisados, mostrando-se potencialmente genotóxicas (Quadro 2). Diferentemente, o produto LF B, que causou efeito inibidor acentuado na proliferação celular, não induziu alterações celulares aos meristemas de raízes.

Quadro 2 – Tipos e número de alterações celulares observados em tecidos meristemáticos de raízes de *Allium cepa* expostos a Hibisco sabdariffa industrializado, nas concentrações 0,15; 0,30 e 0,60 g/ml.

<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Concentração (mg/ml ⁻¹)	TE	MC	PAT	MCN	TAC
LF A	0,15	CO	00	00	01	01 ^a
		24h	14	17	14	45 ^a
		48h	10	13	13	36 ^a
	0,30	CO	00	00	01	01 ^a
		24h	27	21	11	59 ^b
		48h	14	13	09	36 ^b
	0,60	CO	00	00	01	01 ^a
		24h	19	07	23	49 ^b
		48h	13	13	04	30 ^b

Legenda: LF – laboratório farmacêutico; CO – Controle; TE – Tempo de Exposição; MC – metáfase C; PAT – ponte anafásica/telofásica; MCN – micronúcleo; TCA – Total de alterações celulares. Valores seguidos da mesma letra dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si pelo teste χ^2 , ao nível de 5%.

De acordo com Herrero et al. (2012), índices mitóticos significativamente inferiores aos índices dos seus respectivos controles, como os obtidos para LF B (Quadro 1), podem indicar a presença de agentes cuja ação tóxica compromete o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos. Ainda, tais autores declaram que a inibição da proliferação celular desencadeada por compostos citotóxicos em tecidos de intensa proliferação celular e com desempenho normal, como os utilizados nesta pesquisa, é bastante prejudicial ao organismo por inibir ou limitar a reposição de células, alterar a produção de proteínas e resultar no mal funcionamento do órgão onde está localizada.

Ainda, a inibição drástica da divisão em tecidos normais, como a observada na presente pesquisa para esse produto, pode ocorrer pela ação de agentes que afetam a integridade do fuso nuclear durante a mitose promovendo significativo desarranjo cromossômico. Ao considerar que o princípio do ciclo celular é a formação de células idênticas, a produção de novas células com alteração significativa na estrutura e/ou no número

cromossômico tornam o funcionamento celular inviável e tendem a ser eliminadas de tecidos com desempenho normal, o que pode acarretar efeito antiproliferativo significativo (SALES et al., 2016). Tal condição pode ser sugerida para explicar o resultado de citotoxicidade frente à não indução de alterações celulares observada no presente estudo para o produto LF B.

A presença expressiva de alterações de fuso mitótico observadas em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, como as observadas aqui pela ação das concentrações do hibisco industrializado LF A (Quadro 2), são consideradas como um importante parâmetro de genotoxicidade de compostos ou substâncias de interesse (LEME; MARIN-MORALES, 2008). É importante mencionar que há sempre correlação positiva entre a frequência de alterações celulares e o desenvolvimento de câncer em mamíferos (SALES et al., 2016).

Conforme citado anteriormente, produtos farmacêuticos naturais, como os *H. sabdariffa* industrializados avaliados nesta pesquisa, contêm em sua formulação aditivos excipientes artificiais. No entanto não havia discriminado, nos rótulos desses produtos nem na literatura científica, quais excipientes haviam sido utilizados em suas confecções. A partir dos resultados obtidos, apesar de iniciais quanto à temática para essa planta, estes mostram que a composição e/ou concentração de aditivos excipientes utilizadas são diferentes nos dois medicamentos industrializados analisados. Também houve diferença de toxicidade, nas condições de estudo estabelecidas, entre o hibisco nas formas industrializadas e sua forma *in natura*.

A seguir serão relatados resultados de estudos de toxicidade em nível celular de alguns dos compostos excipientes mais comumente utilizados na formulação de produtos farmacêuticos e de alimentos conforme documento disposto pelo governo brasileiro durante a industrialização (SALES et al., 2016). Porém é importante relatar que, com exceção dos corantes e conservantes, todos os microingredientes a serem relatados foram insuficientemente avaliados, até a presente data, quanto aos seus potenciais tóxicos em nível sistêmico e celular.

Para corantes, os únicos autorizados para uso em produtos farmacêuticos em geral são o Amarelo Crepúsculo, a Tartrazina e Vermelho 40, aditivos azoicos por conterem o grupamento azo, um derivado nitroso com a proprie-

dade de produzir amina aromática e ácido sulfanílico, assim como, o Ponceau 4R, Eritrosina e o Azul brilhante (GOMES et al., 2013). Esses seis corantes demonstraram potencial em alterar o *turner-over* das células durante a inter-fase, inibindo expressivamente a divisão celular, e no processo de hiperplasia regenerativa, o que contribuiu, de forma significativa, para o desenvolvimento de cânceres no trato digestório de roedores (SARDI et al., 2010).

Os três corantes azoicos também demonstraram significativo efeito citotóxico e genotóxico às células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*, uma vez que causaram inibição da divisão celular e induziram alterações celulares às células deste sistema teste (GOMES et al., 2013). Foi constatado que a Tartrazina, o Ponceau 4R e a Eritrosina tiveram potencial de promover alterações na divisão celular em células da tireoide de roedores, em função de liberar uma grande quantidade de iodo no organismo desses animais (MORRISON; WRIGHT; JOHN, 2011). Também se verificou que o corante eritrosina, em doses baixas e em tratamento agudo, foi altamente tóxico às células do estômago, cólon e bexiga de ratos Wistar (SASAKI et al., 2002).

Quanto aos edulcorantes permitidos como excipientes, encontra-se o aspartame, o ciclamato de sódio, o acesulfame de potássio e a sacarina sódica (SALES et al., 2016). Verificou-se, por meio das linhagens celulares Caco-2 (células de cólon), HT-29 (células de cólon) e HEK-293 (células de rim), que esses edulcorantes foram citotóxicos e genotóxicos às células estudadas (VAN EYK, 2015). Corroborando aos resultados desses pesquisadores, foi observado, por meio do teste do cometa, que a sacarina sódica e o ciclamato de sódio foram genotóxicos e mutagênicos às células de cólon de roedores, reduzindo significativamente a divisão celular do tecido analisado (SASAKI et al., 2002).

Os antiumectantes utilizados em produtos farmacêuticos são o fosfato de cálcio, o dióxido de silício, o carbonato de cálcio e o carbonato de magnésio (SALES et al., 2016). Não foram encontrados na literatura científica estudos de avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade para os microingredientes fosfato tricálcio e carbonato de cálcio. Entretanto o antiumectante dióxido de silício ocasionou expressiva diminuição da viabilidade celular de linfócitos humanos em cultura de células normais, bem como promoveu alterações celulares em número significativo, demonstrando amplo potencial

genotóxico (RAJIV et al., 2016). Também está relatado na literatura que o aditivo carbonato de magnésio ocasionou a redução do metabolismo celular, em cultura celular de fígado humano de linhagem normal, mostrando-se significativamente citotóxico (AHAMED et al., 2015).

Em relação aos aromatizantes, os ingredientes de aroma e sabor utilizados em medicamentos são somente os de fruta (SALES et al., 2016). A avaliação de alguns desses aditivos mostrou que estes têm a propriedade de induzir danos significativos ao fuso mitótico e, conseqüentemente, na divisão celular de células de sangue periférico humano (GOMES et al., 2013). Também foram genotóxicos a eritrócitos de tecido sanguíneo de camundongos, induzindo de forma expressiva a formação de células micronucleadas na medula óssea dos animais tratados. Porém, entre os constituintes químicos responsáveis em retardar a ação de microrganismos, enzimas, assim como, de agentes físicos nos produtos farmacêuticos, estão o benzoato de potássio, benzoato de sódio e nitrato de potásio, agentes conservantes que foram citotóxicos e genotóxicos a células normais de sangue periférico humano (MPOUNTOUKAS et al., 2010).

Portanto os resultados de citotoxicidade observados para o hibisco LF B e os resultados de genotoxicidade obtidos para esta planta referente LF A sinalizam a necessidade de se avaliar os produtos farmacêuticos de hibisco, assim como os excipientes presentes nesses produtos, em sistemas testes animais, a partir de tratamentos com maiores tempos de exposição, para verificação e aprofundamento dos resultados aqui obtidos.

4 CONCLUSÃO

As três concentrações de chá de hibisco analisadas não foram citotóxicas nem genotóxicas às células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. As três concentrações de hibisco de LF B, bem como as três de LF A, foram citotóxicas genotóxicas, respectivamente, aos meristemas de raízes.

REFERÊNCIAS

AHAMED, M. et al. Comparative cytotoxicity of dolomite nanoparticles in human larynx HEp2 and liver HepG2 cells. *Journal of Applied Toxicology*, v. 35, n. 6, p. 640-50, 2015.

AYRES, M.; AYRES, J. R. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. *BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Brasília: CNPq, 2007.

GOMES, K. M. S.; OLIVEIRA, M. V. G. A.; CARVALHO, F. R. S.; MENEZES, C. C.; PERON, A. P. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Science and Technology*, Campinas, SP, v. 33, n. 1, p. 218-23, jan./mar. 2013.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. *Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002. 340p.

HERRERO, O.; MARTÍN, J. P.; FREIRE, P. F.; LÓPEZ, L. C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. *Mutation Reserch*, Amsterdam, v. 743, n. 1-2, p. 24-34, mar. 2012.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 650, n. 1, p. 80-6, 2008.

MORRISON, J. M.; WRIGHT, C. M.; JOHN, G. H. Identification, isolation and characterization of a novel azoreductase from *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, v. 18, n. 2, p. 229-34, abr. 2012.

MPOUNTOUKAS, P et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food Chemical and Toxicology*, v. 48, n. 10, p. 2934-44, 2010.

RAJIV, S. et al. Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes in vitro. *Human & Experimental Toxicology*, v. 35, n. 2, p. 170-83, 2016.

SALES, I. M. S.; SANTOS, F. K. S.; FEITOZA, L. L.; SOUSA, J. M. C.; PERON, A. P. Toxicity at the cellular level of artificial synthetic flavorings. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 38, n. 3, p. 297-303, jul./set. 2016.

SARDI, M.; HALDEMANN, H.; NORDMANN, B.; BOTTEX, B.; SAFFORD, B.; SMITH, B.; TENNANT, D.; HOWLETT, J.; JASTI, P. R. (2010). Use of retailer fidelity card schemes in the assessment of food additive intake: sunset yellow a case study. *Food Additives and Contaminants Part A*, v. 27, n. 11, p. 1507-15, nov. 2010.

SASAKI, Y. F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, v. 519, n. 1-2, p. 103-19, ago. 2002.

VAN EYK, A. D. The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 38, n. 3, p. 318-27, 2015.